

ISSN 0073-8417

PUBLIKATIONEN ZU WISSENSCHAFTLICHEN FILMEN

SEKTION
BIOLOGIE

SERIE 18 · NUMMER 22 · 1986

Vb. — V FILM D 1588

Elektronenmikroskopische Methodik
Präparation der Grünalge *Micrasterias*



INSTITUT FÜR DEN WISSENSCHAFTLICHEN FILM · GÖTTINGEN

Angaben zum Film:

Tonfilm (Komm., deutsch) 16 mm, farbig, 271 m, 25 min (24 B/s). Hergestellt 1983, veröffentlicht 1985.

Der Film wurde aus vorhandenem Material zusammengestellt und ist für die Verwendung im Hochschulunterricht bestimmt.

Aus dem Institut für Botanik der Universität Salzburg, Dr. U. MEINDL, Ing. D. PINEGGER, Prof. Dr. O. KIERMAYER, und dem Institut für Pflanzenphysiologie der Universität Wien, Prof. Dr. W.G. URL. Bearbeitet und veröffentlicht durch das Institut für den Wissenschaftlichen Film, Göttingen, Dr. H.-K. GALLE; Kamera: Prof. Dr. W.G. URL; Schnitt: C. GOEMANN.

Zitierform:

MEINDL, U., D. PINEGGER, O. KIERMAYER und W.G. URL: Elektronenmikroskopische Methodik – Präparation der Grünalge *Micrasterias*. Film D 1588 des IWF, Göttingen 1985. Publikation von U. MEINDL, W.G. URL und O. KIERMAYER, Publ. Wiss. Film., Sekt. Biol., Ser. 18, Nr. 22/D 1588 (1986), 15 S.

Anschrift der Verfasser der Publikation:

Dr. U. MEINDL, Prof. Dr. O. KIERMAYER, Botanisches Institut der Universität Salzburg, Lasserstr. 39, A-5020 Salzburg.

Prof. Dr. W.G. URL, Institut für Pflanzenphysiologie der Universität Wien, Althanstr. 14, A-1091 Wien.

PUBLIKATIONEN ZU WISSENSCHAFTLICHEN FILMEN

Sektion BIOLOGIE

Sektion ETHNOLOGIE

Sektion MEDIZIN

Sektion GESCHICHTE · PUBLIZISTIK

Sektion PSYCHOLOGIE · PÄDAGOGIK

Sektion TECHNISCHE WISSENSCHAFTEN

NATURWISSENSCHAFTEN

Herausgeber: H.-K. GALLE · Redaktion: E. BETZ, I. SIMON

PUBLIKATIONEN ZU WISSENSCHAFTLICHEN FILMEN sind die schriftliche Ergänzung zu den Filmen des Instituts für den Wissenschaftlichen Film und der *Encyclopaedia Cinematographica*. Sie enthalten jeweils eine Einführung in das im Film behandelte Thema und die Begleitumstände des Films sowie eine genaue Beschreibung des Filminhalts. Film und Publikation zusammen stellen die wissenschaftliche Veröffentlichung dar.

PUBLIKATIONEN ZU WISSENSCHAFTLICHEN FILMEN werden in deutscher, englischer oder französischer Sprache herausgegeben. Sie erscheinen als Einzelhefte, die in den fachlichen Sektionen zu Serien zusammengefasst und im Abonnement bezogen werden können. Jede Serie besteht aus mehreren Lieferungen.

Bestellungen und Anfragen an: Institut für den Wissenschaftlichen Film

Nonnenstieg 72 · D-3400 Göttingen

Tel. (05 51) 20 22 02

FILME FÜR FORSCHUNG UND HOCHSCHULUNTERRICHT

URSULA MEINDL, DORIS PINEGGER, OSWALD KIERMAYER, Salzburg, WALTER G. URL, Wien:

Film D 1588

Elektronenmikroskopische Methodik Präparation der Grünalge *Micrasterias*

Verfasser der Publikation: URSULA MEINDL, OSWALD KIERMAYER und WALTER G.

URL

Mit 3 Abbildungen

Inhalt des Films:

Elektronenmikroskopische Methodik – Präparation der Grünalge *Micrasterias*. In vorliegendem Film wird das Aufsammeln von Zieralgen (vor allem *Micrasterias*) im Hochmoor und die anschließende Herstellung semi-steriler Algenkulturen gezeigt. Mit der Grünalge *Micrasterias* als Modellzelle werden sodann die einzelnen Schritte bei der Präparation für die Transmissions-Elektronenmikroskopie wie Fixierung, Einbettung in Kunstharz, Herstellung von Ultradünnschnitten, Nachkontrastierung, sowie die eigentliche Elektronenmikroskopie (Bildherstellung und Auswertung) demonstriert.

Summary of the Film:

Electronmicroscopic Technique – Preparation of the Green Alga *Micrasterias*. In this film the collection of Desmids (especially *Micrasterias*) in peat bogs and the following establishment of semi-sterile algae cultures is shown. With the green alga *Micrasterias* as a model-cell the different preparative steps for transmission-electron microscopy e.g. fixation, embedding into plastic, ultrathin sectioning, staining and electron microscopy (taking of pictures and its interpretation) is demonstrated.

Résumé du Film:

Méthodologie au microscope électronique – Préparation de l'algue verte *Micrasterias*. Le film montre le ramassage d'algues ornementales (avant tout de *Micrasterias*) dans un marais et la production de cultures d'algues semi stériles. Avec l'algue verte *Micrasterias* comme cellule modèle, on montre ensuite les différentes étapes de la préparation de la microscopie électronique de transmission, comme fixation, enrobage dans de la résine synthétique, préparation de coupes ultraminces, formation de contrastes ultérieurs, ainsi que la microscopie électronique proprement dite (production d'images et dépouillement).

Allgemeine Vorbemerkungen

Filmobjekt

Aufsammeln von Algen

Unter den Desmidiaceen findet man die größten und auch schönsten Formen pflanzlicher Einzeller. In der zellbiologischen Forschung sind sie wegen ihrer bizarren Formen für entwicklungsbiologische Untersuchungen von größter Bedeutung (Zusammenfassung bei KIERMAYER [5]).

Eine große Zahl von Desmidiaceenarten sind als Reinkulturen von spezialisierten Instituten („Culture collection of Algae, Austin, University of Texas, USA“, „Sammlung von Algenkulturen Göttingen, Pflanzenphysiologisches Institut der Universität Göttingen, BRD“) erhältlich, eine Neuaufsammlung aus Originalstandorten ist aber sinnvoll und immer wieder notwendig. Die Desmidiaceen sind mit wenigen Ausnahmen Süßwasseralgen und besiedeln zumeist nährstoffarme Biotope, vornehmlich Moorgewässer.

In Mitteleuropa sind Moore des österreichischen Alpengebietes gut untersuchte Fundorte verschiedenster Desmidiaceen, wobei hier der Lungau (Bundesland Salzburg) besondere Bedeutung hat (LOUB [10], PRUZSINSZKY und URL [14], WURM [18]). Hier gibt es im östlichen Teil größere Mooransammlungen, wobei der Schwingrasen des Seethaler Sees, der östlich von Tamsweg nahe der Wasserscheide zwischen Schwarzbach und Leisnitzbach liegt, von internationaler Bedeutung ist und vor allem auch wegen seiner Algenflora zum Naturdenkmal erklärt wurde.

Die verschiedenen Desmidiaceen-Arten sind in den Moorgewässern (Schlenken, Blänken) nicht in gleicher Weise verteilt. Die MooralgensozioLOGIE (LOUB et al. [11], FETZMANN [3]) bemüht sich die Zusammensetzung der Algen- bzw. Desmidiaceengesellschaften in ihrer Abhängigkeit von Standortfaktoren zu erfassen. Für alpine Moore wurde eine Gliederung nach pH-Wert und Alkalinität versucht, die in die Aufstellung von Zonen mündete, wobei die Zone A dem saueren Hochmoor zugeordnet wurde und die weiteren Zonen bis Zone F über das Zwischenmoor zum Flachmoor reichen; pH-Wert und Alkalinität steigen dabei zunehmend an.

Die im Film gezeigte Aufsammlung zielte auf großzellige Desmidiaceen ab, vor allem auf *Micrasterien* und hier wieder auf die für Untersuchungen über Morphogenese vielverwendete *Micrasterias denticulata*. Es ist ein Organismus der in Schlenken der Zwischenmoorzonen (C), bei pH-Werten von 5,5 – 6,0 häufig anzutreffen ist und hier zusammen mit anderen großen Desmidiaceen (Closterien, Netrien) oft in großen Mengen vorkommt.

Für die Aufsammlung von Mooralgeln haben sich kantengeschärfte größere Löffel bestens bewährt. Man schöpft damit die Algen vom Boden der Schlenken ab oder hebt sie von submersen Teilen der Moorpflanzen ab. Desmidiaceen bewegen sich durch Abscheiden eines Schleimes aus speziellen Porenfeldern (URL und KUSEL-FETZMANN [21]) und haben dadurch die Möglichkeit vom Boden der Schlenke aufzusteigen. Sie sitzen dann in großer Zahl in den sog. Türmchen oder Algenbäumchen (KREBS [7]) und können so relativ detritusfrei aufgesammelt werden. Für eine lange Haltbarkeit der Originalaufsammlung ist aber eine gewisse Detritusmenge von Vorteil.

Vor dem Einsammeln wird die Artenzusammensetzung der Probe mit Hilfe eines Feldmikroskopes (sog. Algensucher) bei schwächerer Vergrößerung kontrolliert. Bei einer 40 – 60fachen Vergrößerung ist eine sichere Ansprache zumindest der größerzelligen Desmidiaceen möglich.

Die Sammelfläschchen haben Inhalte von 50 – 100 ml, größere haben sich weniger bewährt. Sie werden bei Kunstlicht in Kühlkammern oder auch nur an nordseitigen Fenstern aufbewahrt. Die Algen halten sich dabei z.T. viele Jahre lang.

Anlegen von Reinkulturen

Die im Freiland gesammelten Algen sind zwar für zellphysiologische Untersuchungen geeignet (CHOLNOKY und HÖFLER [2]) können jedoch für chemisch-physiologische, entwicklungs-physiologische oder elektronenmikroskopische Untersuchungen kaum verwendet werden. Für diese Zwecke müssen Reinkulturen (vgl. PRINGSHEIM [13]) bestimmter Arten angelegt werden, bei denen reproduzierbare Kulturbedingungen (chemisch definierte Nährlösungen, konstante Licht- und Temperaturverhältnisse) herrschen. Die in vorliegendem Film verwendete Desmidiacee *Micrasterias denticulata* Bréb. (Abb. 1) läßt sich relativ einfach in Nährlösung kultivieren und stellt auch aus diesem Grund ein vieluntersuchtes Objekt (vgl. KIERMAYER [5]) dar. Die Herstellung einer Reinkultur von *Micrasterias denticulata* soll nachfolgend beschrieben werden:

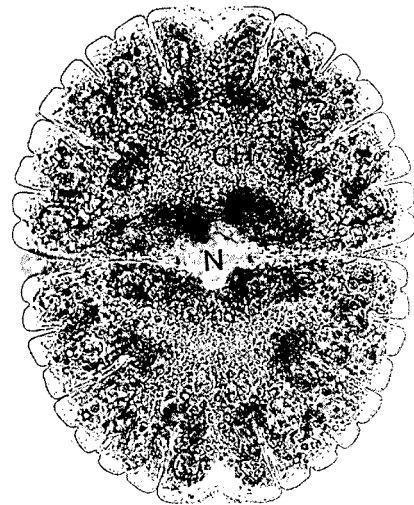


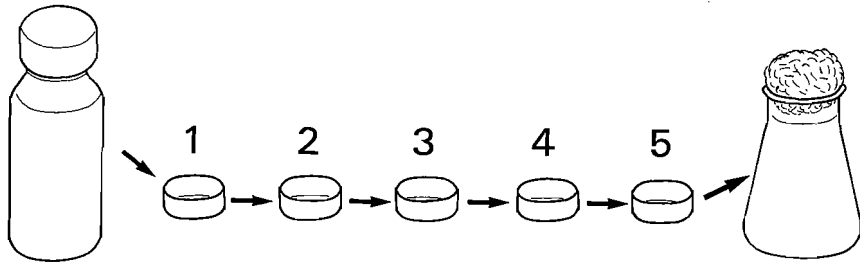
Abb. 1. Lichtmikroskopische Abbildung der Grünalge *Micrasterias denticulata* Bréb., die im Film als Modell-Zelle verwendet wurde. Vergrößerung 650 ×

Ch: Chloroplast; N: Zellkern

Unter dem Stereomikroskop oder einem Binokular in einer sterilen Bank werden mittels einer Mikropipette bestimmte Algenzellen in eine sterile Petrischale überführt, die sterile Nährlösung enthält. Hier werden die Algen vorgewaschen. Mit Hilfe steriler Mikropipetten werden die Algen sodann in weiteren 4 – 8 sterilen Übertragungen in Petrischalen in jeweils steriler Nährlösung durchgeschwemmt und schließlich in einem mit steriler Nährlösung gefüllten (etwa 30 ml) Erlenmeyerkolben überführt. Der Arbeitsgang ist in

Abb. 2 graphisch dargestellt. Die Kolben werden mit einem sterilen Wattestopfen verschlossen, beschriftet und in einem Kulturschrank bei einer Temperatur von $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ und einem Licht-Dunkelrhythmus (14 Std. Licht, 10 Std. Dunkelheit) gehalten.

WASCHVORGANG



MOORPROBE

ca. 10 ZELLEN

Abb. 2. Schematische Darstellung des Waschvorganges zur Gewinnung semisteriler Kulturen von Desmidiaceen insbesondere *Micrasterias* (genauere Angaben siehe Text)

Die Nährlösung für die *Micrasterias denticulata*-Kultur (Nährlösung nach WARIS [17]) ist folgendermaßen zusammengesetzt:

KNO_3	0,1	g
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0,02	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,02	g
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,05	g
FeSO_4	0,001	g

in 1000 ml Aqua bidest.

Je 30 ml Nährlösung werden in 100-ml-Weithals-Erlenmeyerkolben gefüllt. Die Kolben werden mit einem Wattestopfen und einer Aluminiumfolie verschlossen und eine Stunde im Dampftopf bei 100°C sterilisiert.

Auswahl der Zellen

Für viele Fragestellungen können bei *Micrasterias denticulata* Zellen im Zustand der Zellteilung und Entwicklung des charakteristischen Zellmusters verwendet werden (zusammenfassende Darstellungen siehe KIERMAYER [5], KIERMAYER und MEINDL [6]). Teilungsstadien sind schon im Binokular bei schwacher Vergrößerung daran erkenntlich, daß die beiden Halbzellen der *Micrasterias*-Zelle weit auseinandergewichen sind und jede Halbzelle eine neue Halbzelle (anfänglich nur als kleiner Bulbus erkenntlich) ausgebildet hat.

Die Zellentwicklung von *Micrasterias* wurde in mehreren Filmen mit Hilfe von Zeitraffung dargestellt (KIERMAYER [19], MEINDL [20]).

Für die elektronenmikroskopische Präparation (ausführliche allgemeine Darlegung vgl. LANGE und BLÖDORN [8], LICKFELD [9]) werden unter dem Binokular Teilungsstadien

mit einer Mikropipette einer in eine Petrischale gegossenen Algenkultur entnommen, in einer kleinen Petrischale oder einem Röhrchen gesammelt und in die Fixier- und Entwässerungsapparatur (Fixomat, siehe nachfolgendes Kapitel) überführt.

Fixierung und Einbettung

Die Fixierung der ausgewählten *Micrasterias*-Zellen für die Elektronenmikroskopie erfolgt durch eine kombinierte Behandlung mit Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid (genaue Angaben über die speziell für *Micrasterias* ausgearbeitete Methode vgl. KIERMAYER ([4]), MEINDL ([12]). Diese wird gemeinsam mit der darauffolgenden Entwässerung der Zellen in einem speziellen Fixiergerät mit Temperaturregelung (Fixomat, Balzers; TREIBLMAYR und POHLHAMMER [16]) durchgeführt, das sich für die Behandlung von Einzelzellen als besonders geeignet erwiesen hat. Die Zellen werden dazu in Mikrofilternutschen überführt, die am Gerät befestigt werden und durch die die jeweilige Lösung nach unten abgesaugt wird, während mit Hilfe einer Spritze die nächste Lösung von oben zugegeben wird. Nach dem Absaugen der Nährlösung wird als erstes Fixierungsmittel Glutaraldehyd in einer Konzentration von 1% in 0,05 M Kaliumphosphatpuffer appliziert. Die Fixierdauer beträgt 10 Minuten, die Glutaraldehydfixierung erfolgt bei Raumtemperatur. Im Anschluß daran erfolgt ein Waschprozeß, bei dem die Zellen durch mehrmaliges Durchsaugen von Waschlösung (0,05 Kaliumphosphatpuffer) von Glutaraldehydresten befreit werden. Zur 2. Fixierung und erster Kontrastierung werden die Zellen mit einer 2%igen Osmiumtetroxidlösung (in 0,05 M Phosphatpuffer) 24 Stunden lang bei einer Temperatur von 4°C behandelt. Darauf folgt ein weiterer Waschprozeß und schließlich die Entwässerung über eine ansteigende Konzentrationsreihe von Äthanol (15%, 30%, 40%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%), wobei die Zellen jeweils 15 Minuten in den einzelnen Konzentrationen verbleiben. In 100%igen Äthanol wird die Behandlungsdauer auf 30 Minuten verlängert. Der gesamte Entwässerungsvorgang erfolgt bei 4°C.

Zur weiteren Kontrastierung der Zellen werden sie anschließend in 100%igen Äthanol gesättigt mit Bleiacetat, für 1 – 1½ Stunden bei Raumtemperatur behandelt. Da Äthanol mit dem Einbettungsmittel Epon nicht mischbar ist, wird der Alkohol anschließend durch Propylenoxid, das als Intermedium und weiteres Entwässerungsmittel dient, ersetzt. Nach 3maliger 5minütiger Behandlung mit Propylenoxid wird die Mikrofilternutsche vom Fixiergerät genommen. Die Zellen werden mit Hilfe einer Spritze vom Filter gespült und in ein geeichtes Röhrchen übertragen. Dem Propylenoxid mit den fixierten und entwässerten Algenzellen wird ein Epongemisch, bestehend aus Epon 812, MNA (Methyl-Nadic-Anhydrid) und DMP (Dimethylphthalat) in gleicher Menge zugesetzt. Zum Durchmischen der beiden Substanzen, sowie zum restlosen Abdampfen des Propylenoxids wird das Röhrchen in ein Mischrad gesteckt und 48 Stunden lang gleichmäßig bewegt. Im Anschluß daran wird das nun zähflüssig gewordene Epon-Gemisch mit den Algen in eine Petrischale geleert und die Zellen unter dem Binokular mit einem zugespitzten Holzstäbchen in ein Aluminiumschälchen mit frischem Epongemisch übertragen. Zur Entfernung letzter Feuchtigkeitsreste werden die Aluminiumschälchen für 4 Tage im Exsikkator getrocknet. Die Auspolymerisierung des Epongemisch erfolgt anschließend 48 Stunden lang im Polymerisationsofen bei 60°C.

Ultramikrotomie und Nachkontrastierung

Für das Einschleusen der Präparate in das Elektronenmikroskop ist es notwendig, von den im Epon eingebetteten Algenzellen feinste Schnitte herzustellen (Ultramikrotomie; vgl. REID [15]). Zu diesem Zweck wird das ausgehärtete Epon mit den eingebetteten Algenzellen durch Aufreißen der Aluminiumschälchen diesen entnommen. Unter dem Stereomikroskop werden die Epon-Plättchen sodann nach geeigneten Zellen abgesucht und entsprechende Zellen mittels einer Nadel markiert. Die so markierten eingebetteten Zellen werden sodann im Lichtmikroskop einer nochmaligen Kontrolle unterzogen und für einen späteren Vergleich mit den entsprechenden elektromikroskopischen Aufnahmen fotografiert. Die endgültig ausgewählten und fotografierten Zellen werden schließlich mit einem heißen Skalpell aus dem Epon-Plättchen herausgeschnitten und die kleinen Epon-Stückchen mit jeweils nur einer Zelle entsprechend orientiert, mit Epon-Kleber auf einen vorher hergestellten oder gekauften Eponblock geklebt und zur Aushärtung des Klebers bei 60°C in einen Ofen gestellt.

Als Objektträger kommen für die Elektronenmikroskopie kleine Kupfernetzchen (Durchmesser 3 mm) zur Verwendung, auf die die bei der Ultramikrotomie hergestellten Schnitte gelegt werden. Vor dem Auflegen der ultradünnen Schnitte müssen die Kupfernetzchen mit einer Kunststoffolie „befilmt“ werden, um den Schnitten eine erhöhte Stabilität unter dem Elektronenstrahl zu geben. Die Filme für die Kupfernetzchen werden aus einer 0,3%igen Formvar-Lösung (in Chloroform) hergestellt.

Zur Herstellung der Formvar-Schicht auf dem Objektträger („Befilmung“) wird vorerst ein gut gereinigter Glas-Objektträger kurz in die Formvar-Lösung eingetaucht und wieder herausgezogen. Nach Verdampfen des Chloroforms bleibt der Glas-Objektträger mit einem hauchdünnen Kunststoffilm bedeckt. Mittels einer Nadel wird der Objektträger und die Formvarschicht an den Rändern geritzt und schließlich die feine Folie auf einer Wasseroberfläche abschwimmen gelassen. Auf diesen, nun auf der Wasseroberfläche einer größeren Petrischale schwimmenden Kunststoff-Film, werden die vorher gut mit Aceton gereinigten Kupfernetzchen (grids) gelegt. Über die schwimmenden Netzchen wird nunmehr eine Kunststoff-Folie (oder Linsenpapier) gelegt, die Folie mit den nun mit Formvar beschichteten Netzchen abgehoben und in eine mit Trockenmittel versehene Petrischale gelegt. Solcherart vorpräparierte Kupfernetzchen stehen nunmehr für das Aufnehmen der Ultradünnschnitte bereit.

Der eigentliche Schneideprozeß (Ultramikrotomie) erfolgt in einer speziellen Schneideapparat, dem Ultramikrotom. Vor dem Einführen der auf einen Eponblock geklebten Zellen in den Halter des Ultramikrotoms, muß der Eponblock mittels eines „Trimmers“ zu einer Pyramidenform zurechtgetrimmt werden. Nach einer weiteren „Feintrimmung“ mittels einer Rasierklinge kann der Schneidevorgang am Ultramikrotom gestartet werden. Die an einem Diamantmesser entstehenden ultradünnen Schnitte (Schnittbänder), deren Dicke an ihren Interferenzfarben erkenntlich ist, schwimmen auf der Wasseroberfläche eines zum Messer gehörigen wassergefüllten Troges und können von dort auf die Kupfernetzchen aufgenommen werden. Vor dem Aufnehmen der Schnitte werden diese zu ihrer Glättung mit Trichloräthylendampf gespreitet. Die mit den Schnitten versehenen Kupfernetzchen werden nach Trocknung in einer speziellen Aufbewahrungsschachtel (grid box) aufbewahrt. Um einen noch besseren Kontrast der Schnitte im

Elektronenmikroskop zu erhalten, werden diese einer sog. „Nachkontrastierung“ unterworfen. Diese besteht in einer kombinierten Behandlung der Schnitte mit Uranylacetat und Bleicitrat. Die so präparierten und getrockneten Schnitte stehen nun für die eigentliche Elektronenmikroskopie bereit.

Elektronenmikroskopie und Auswertung

Zum Einschleusen in das Elektronenmikroskop wird ein Kupfernetzchen mit den zu untersuchenden kontrastierten Schnitten an einem Kupferstab, der als Präparathalter dient, befestigt. Dieser wird zunächst in die Präparatschleuse des Elektronenmikroskops eingeführt und nach Wiederherstellung des Vorvakuums in diesem Bereich in die unter Hochvakuum stehende Säule eingeschleust. Um Kontaminationen zu verhindern, wird zur Kühlung noch vor dem Einschalten der Kathode ein Dewar-Gefäß, das durch einen Kühlfinger mit dem Objektraum in Verbindung steht, mit flüssigem Stickstoff gefüllt. Die anschließende Arbeit am Elektronenmikroskop erfolgt bei Dunkelheit oder bei schwachem Rotlicht als Raumbeleuchtung.

Ist das Gerät bereits vorjustiert, so wird nun durch Anlegen der Beschleunigungsspannung und der Heizspannung sowie durch Regulierung des Kondensors eine gleichmäßige Ausleuchtung des Fluoreszenzschirmes des Elektronenmikroskops möglich. Durch die Wahl einer für die Dicke des Objekts geeigneten Beschleunigungsspannung sowie durch die Kombination von Kondensorblende und Objektivblende wird die Entstehung einer in Helligkeit und Kontrast optimalen Abbildung gewährleistet.

Mit Hilfe der Objektverschiebung wird bei niedriger Vergrößerung des Schnittes auf eine geeignete Bildstelle eingestellt, wobei die Ausleuchtung des Bildschirms und die Bildschärfe ständig reguliert werden. Am vergrößerten Schnitt werden durch Verschiebung des Objekts die für die jeweilige Untersuchung interessanten Stellen ausgewählt und fotografiert. Die Belichtung der Schnittfilme erfolgt automatisch, die Dauer der Belichtung wird mit der Helligkeitsregulierung eingestellt. Sind mehrere Negative belichtet und ist die Untersuchung am eingeschleusten Objekt abgeschlossen, so wird der Kamerabereich des Elektronenmikroskops zur Entnahme der Filmkassette mit Stickstoff belüftet. Die Negative werden der Kassette und ihren Rahmen entnommen und in Drahtkörbe gesteckt, in denen sie anschließend in der Dunkelkammer entwickelt werden. Die Filmkassette des Elektronenmikroskops wird mit vorgetrocknetem Negativmaterial wieder aufgefüllt und in den Kameraraum eingeführt. Nach der Evakuierung des Kameraraums ist das Gerät wieder betriebsbereit.

Die Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgt durch Vergleich der vergrößerten Kopien mit dem während der Arbeit am Elektronenmikroskop erstellten Protokoll (allgem. Darstellungen vgl. AGAR et al. [1], LICKFELD [9], LANGE und BLÖDORN [8]).

Zur Entstehung des Films

Der Film entstand – bis auf die ersten Szenen, die im Lungau (Bundesland Salzburg) gefilmt wurden – in den Laboratoriumsräumen des Instituts für Botanik der Universität Salzburg, Abteilung für Pflanzenphysiologie und Zellbiologie (Leiter Prof. Dr. O. KIEMAYER).

Die Ausleuchtung erfolgte mit marktüblichen Halogenleuchten, als Kamera diente eine Bolex-EL mit verschiedenen Objektiven, wobei sich das Makro-Switar 25 mm 1:1 besonders bewährte. Kameraarbeit und Regie lagen in den Händen von Prof. Dr. W. URL. Als Filmmaterial wurde Eastman Colour Negative II 5247 verwendet, die Aufnahme der elektronenoptischen Bilder erfolgte mit dem Colour High Speed Negative Film 5294. Von den gezeigten Geräten sollen nur das Philips Transmissionselektronenmikroskop 400 T, das Ultramikrotom Ultracut von Reichert und das Fixiergerät Fixomat von Balzers erwähnt werden.

Der Film ist als Demonstrations- und Unterrichtsfilm konzipiert, um den Studierenden die Arbeitsschritte für elektronenmikroskopische Untersuchungen zu zeigen, er ist aber nicht als Arbeitsanleitung gedacht.

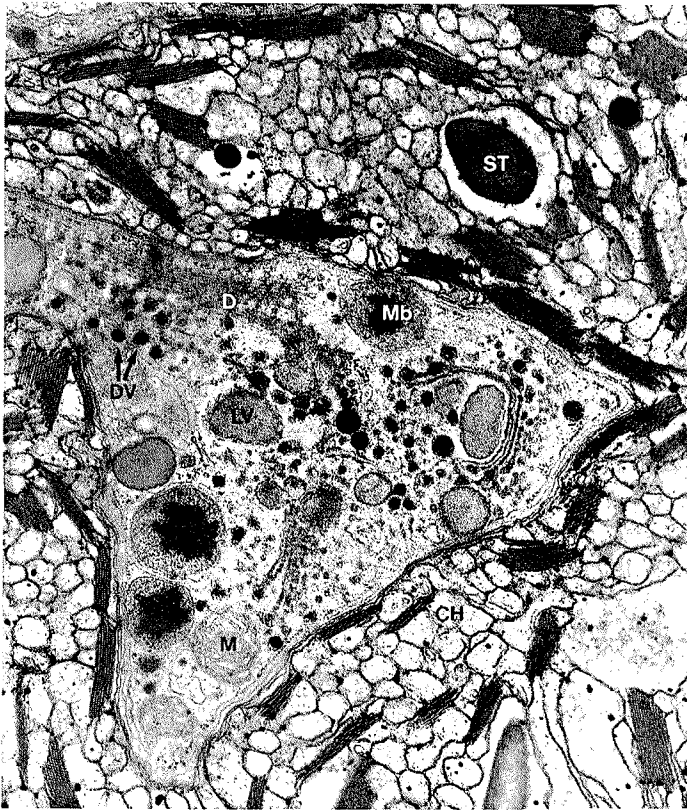


Abb. 3. Elektronenmikroskopische Darstellung eines Cytoplasma-Bereichs von *Micrasterias denticulata* Bréb. (Originalabbildung aus dem Film) Vergrößerung: 36.000 ×
Ch: Chloroplast, St: Stärkekorn, D: Dictyosom, Mb: Microbody, M: Mitochondrium, DV: D-Vesikel (mit Zellwandmaterial), LV: L-Vesikel (mit Schleimmaterial)

Erläuterungen zum Film

Wortlaut des gesprochenen Kommentars¹

Aufsammeln von Algen – Anlegen von Reinkulturen

Moorgewässer des Alpengebietes sind Biotop mit zahlreichen Jochalgen-Arten.

Am Seethalersee im Salzburger Lungau enthält das Schwinggrasmoor viele großzellige Desmidiaceen wie *Micrasterias denticulata*.

Aus seichten Schlenken wird Algenmaterial mit einem Löffel entnommen und nach Kontrolle im Feldmikroskop in Probenfläschchen gesammelt.

Zusammensetzung und Dichte der Algenproben werden im Labor geprüft.

Sie enthalten neben Vertretern der Gattungen *Closterium* und *Netrium* vorwiegend die Art *Micrasterias denticulata*.

Für die Anzucht wird *Micrasterias denticulata* aus einer Probe isoliert.

Um Sekundärinfektionen zu vermeiden, arbeitet man unter sterilen Bedingungen.

Aus der Originalprobe werden die Algen möglichst ohne Ditritus entnommen.

Mit steriler Waris-Nährlösung wird verdünnt und gewaschen.

Über mehrere Passagen werden die Zellen in frische, sterile Nährlösung übertragen.

Nach achtmaligem Wechsel der Nährlösungen überführt man die Zellen zur Aufzucht in Erlenmeyerkolben.

Diese werden in Lichtkulturschränken aufgestellt. Die Algen wachsen optimal bei 20°C in einem 10- zu 14stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus.

Auswahl der Zellen

Fixierung und Einbettung

Aus der Kultur werden einzelne Zellen pipettiert.

Teilungsstadien sind bevorzugte Untersuchungsobjekte.

Für die Elektronenmikroskopie werden die Zellen einer Fixierungs- und Entwässerungsprozedur unterzogen.

Für einzellige Algen hat sich ein spezielles Gerät mit Temperaturregelung bewährt, bei dem Mikrofilternutschen für den notwendigen Wechsel der Lösungen Verwendung finden.

Die Algen werden in die Nutschen übertragen.

Zur Fixierung füllt man eine Spritze mit Glutaraldehyd-Lösung und setzt sie auf die Nutsche.

Die Nährlösung wird abgesaugt und dann die Fixierlösung zugeführt.

Die Fixierdauer beträgt zehn Minuten.

Auf das Waschen mit Phosphatpufferlösung folgt eine zweite Fixierung, die erste Kontrastierung mit Osmiumtetroxid-Lösung.

Die Lösung wird abgesaugt. Osmiumtetroxid wird zugefügt und die Temperatur auf 4°C abgesenkt.

In steigender Äthanol-Konzentration werden die Zellen entwässert.

Jede Entwässerungsphase dauert fünfzehn Minuten.

Bei Raumtemperatur erfolgt in der letzten Äthanolstufe eine weitere Kontrastierung durch beigefügtes Bleiacetat.

¹ Die *Kursiv*-Überschriften entsprechen den Zwischentiteln im Film.

Propylenoxid – als Intermedium zwischen Äthanol und dem Einbettungsgemisch – entfernt letzte Wasserreste.

Die Nutsche wird dem Fixier- und Entwässerungsgerät entnommen.

Mehrmaliges Einspritzen mit Propylenoxid löst die Algen vom Filter. Sie werden in ein geeichtes Röhrchen gegossen.

Nach dem Absetzen der Algen saugt man überschüssiges Propylenoxid ab.

Als Einbettungsmittel dient Epon, das in gleicher Menge dem restlichen Propylenoxid zugefügt wird.

Zum Durchmischen sowie zum Abdampfen des Propylenoxids stellt man das Probenröhrchen in ein Mischrad.

48 Stunden später wird das dickflüssig gewordene Epon mit den Algen in eine Petrischale gegossen.

Unter dem Stereomikroskop entnimmt man mit einem zugespitzten Holzstäbchen geeignete Zellen und überträgt sie in frisches Epon.

Die Verteilung der Zellen und ihre Lage im Einbettungsmedium werden kontrolliert.

Im Exsikkator werden über 4 Tage letzte Feuchtigkeitsreste aus dem Epon entfernt.

Zur Auspolymerisierung des Epons wird das Schälchen bei 60°C in einem Ofen über 2 Tage aufbewahrt.

Ultramikrotomie und Nachkontrastierung

Nachdem das ausgehärtete Epon mit den eingebetteten Algen dem Aluminiumschälchen entnommen wurde, markiert man unter dem Stereomikroskop geeignete Zellen.

Bei stärkerer Vergrößerung erfolgt eine nochmalige Kontrolle der ausgewählten Zellen.

Sie werden für eine spätere Zuordnung fotografiert.

Mit einem erhitzten Skalpell schneidet man aus dem Epon kleine Stückchen mit je einer Zelle heraus.

Jedes Präparat wird auf einen Eponblock geklebt.

Die Härtung des Klebers erfolgt im Ofen.

In der Elektronenmikroskopie dienen kleine Kupfernetzchen als Objektträger.

Um für die Ultradünnschnitte der Zellen eine stabilere Auflage zu erhalten, werden die Netzchen mit einem dünnen Formvar-Kunststoff-Film beschichtet.

Der angetrocknete Formvar-Film wird auf dem Objektträger geschnitten und in destilliertem Wasser abgelöst.

Er schwimmt auf der Oberfläche. Die Kupfernetzchen werden auf den Film gelegt.

Mit einer Kunststoff-Folie werden die beschichteten Netzchen von der Wasseroberfläche aufgenommen – und in einer Petrischale mit Silicagel getrocknet.

Für die nachfolgende Ultramikrotomie wird das Eponstückchen mit einem speziellen Fräser auf geeignete Form und Größe zurechtgetrimmt.

Der getrimmte Eponblock wird in den Objekthalter eines Ultramikrotoms eingespannt.

Vor der Herstellung der Ultradünnschnitte wird mit einer Rasierklinge eine letzte Feintrimmung durchgeführt.

Den Objekthalter befestigt man am Arm des Ultramikrotoms.

Nach dem Aufsetzen des Messerblocks wird ein Diamantmesser eingesetzt.

Es besteht aus einem geschliffenen Diamanten, dem eigentlichen Messer, und einem Trog, der mit destilliertem Wasser gefüllt wird.

Eine kleine Pumpvorrichtung erlaubt die Feinregulierung des Wasserspiegels.

Der Messerblock wird an das Objekt herangeführt. Der Schneidvorgang beginnt.

Durch automatisches Vorschieben des Armes gegen das Messer entstehen ultradünne Schnitte, die als Band auf der Wasseroberfläche schwimmen.

Die Schnitte werden mit Trichloräthylendampf gespreitet und dann mit einem feinen Haar zusammengeschoben.

Mit einem befilmten Objektträgernetzchen werden die Schnitte aufgenommen und zum Trocknen auf Filterpapier gelegt.

Nach dem Trocknen bewahrt man die Objektträgernetzchen in einer sog. „grid box“ auf.

Die Nachkontrastierung der Schnitte erfolgt durch eine kombinierte Behandlung mit Uranylacetat und Bleicitrat.

Dazu werden die Objektträgernetzchen zunächst auf Tropfen einer Uranylacetat-Lösung gelegt und lichtdicht abgedeckt.

Nach dreimaligem Waschen und Abtrocknen erfolgt die weitere Kontrastierung auf Bleicitrat.

Die Netzchen werden, wieder nach mehrmaligem Waschen und Trocknen, in eine Petrischale mit Trockenmittel gelegt.

Zu einem späteren Zeitpunkt, aber auch schon unmittelbar nach dem Trocknen, kann das Präparat in das Elektronenmikroskop eingeschleust werden.

Elektronenmikroskopie — Auswertung

In einen Objekthalter wird das Kupfernetzchen eingelegt und befestigt.

Den Halter führt man über eine Schleuse in die unter Hochvakuum stehende Säule des Elektronenmikroskops ein.

Die Vorrichtung zur Kühlung des Objektraumes wird mit flüssigem Stickstoff gefüllt.

Im abgedunkelten Raum wird am justierten Gerät unter Beschleunigungsspannung bei eingeschaltetem Elektronenstrahl die Beleuchtungsintensität reguliert.

Durch Verschieben des Präparates lassen sich interessante Stellen am Objekt auswählen.

Eine optimale Abbildung erreicht man durch kombiniertes Einstellen von Vergrößerung, Beleuchtungsintensität und Bildschärfe.

Das elektronenmikroskopische Bild wird fotografiert.

Die Belichtung erfolgt vollautomatisch.

Nach der Belüftung des Kameraraumes wird die Filmkassette entnommen.

Die belichteten Planfilme werden zur Entwicklung in ein Drahtgestell gesteckt.

Die Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgt anhand vergrößerter Abzüge.

Literatur

- [1] AGAR, A.W., R.H. ALDERSON and D. CHESCOE: Principles and Practice of Electron Microscope Operation. In: Practical Methods in Electron Microscopy (ed. A.M. GLAUERT) North-Holland Publishing Comp. Amsterdam — London 1974.

- [2] CHOLNOKY, B. von, und K. HÖFLER: Vergleichende Vitalfärberversuche an Hochmooralgen. Sitz. Ber. Österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, **159** (1950), 143–182.
- [3] FETZMANN, E.L.: Beiträge zur Algensoziologie. Sitz. Ber. Österr. Akad. Wiss. math.-nat. Kl. Abt. I. **165**, (1965), 709–783.
- [4] KIERMAYER, O.: The distribution of microtubules in differentiating cells of *Micrasterias denticulata* Bréb. *Planta* **83** (1968), 223–236.
- [5] KIERMAYER, O.: Cytoplasmic Basis of Morphogenesis in *Micrasterias*. In: *Cytomorphogenesis in Plants* (ed. O. KIERMAYER) Cell Biology Monographs, Vol. **8** Vienna/New York 1981.
- [6] KIERMAYER, O., und U. MEINDL: Interaction of the Golgi-Apparatus and the Plasmalemma in the Cytomorphogenesis of *Micrasterias*. In: *Compartments in Algal cells and their Interaction* (ed. W. WIESSNER, D. ROBINSON and R.C. STARR), Berlin/Heidelberg 1984.
- [7] KREBS, I.: Beiträge zur Kenntnis des Desmidiaceen-Protoplasten. Sitz. Ber. Österr. Akad. Wiss. math.-nat. Kl., Abt. I, **160** (1951), 579–613.
- [8] LANGE, R.H., und J. BLÖDORN: *Das Elektronenmikroskop: TEM + REM*. Stuttgart – New York 1981.
- [9] LICKFELD, K.: *Elektronenmikroskopie*. Eugen-Ulmer -Verlag 1979.
- [10] LOUB, W.: Zur Algenflora der Lungauer Moore. Sitz. Ber. Österr. Akad. Wiss. math.-nat. Kl., Abt. I, **162** (1953), 545–569.
- [11] LOUB, W., W. URL, O. KIERMAYER, A. DISKUS, K. HILMBAUER und O. KIERMAYER: Die Algenzonierung in Mooren des österreichischen Alpengebietes. Sitz. Ber. Österr. Akad. Wiss. math.-nat. Kl., Abt. I, **163** (1954), 447–494.
- [12] MEINDL, U.: Cytoskeletal Control of Nuclear Migration and Anchoring in Developing Cells of *Micrasterias denticulata* and the Change Caused by the Anti-Microtubular Herbicide Amiprophos-methyl (APM). *Protoplasma* **118** (1983), 75–90.
- [13] PRINGSHEIM, E.G.: Die Kultur der Desmidiaceen. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* **36** (1918), 482–485.
- [14] PRUZSINSZKY, S., und W. URL: Ein Beitrag zur Desmidiaceenflora des Lungau. Sitz. Ber. Österr. Akad. Wiss. math.-nat. Kl., Abt. I **170** (1961), 1–8.
- [15] REID, N.: Ultramicrotomy. In: *Practical Methods in Electron Microscopy* (ed. A.M. GLAUERT). North-Holland Publishing Comp. Amsterdam – New York – Oxford 1980.
- [16] TREIBLMAYR, K., und K. POHLHAMMER: Die Verwendung eines Mikrofiltergerätes bei der Fixierung und Entwässerung kleiner biologischer Objekte der Elektronenmikroskopie. *Mikroskopie* **30** (1974), 229–233.
- [17] WARIS, H.: Cytophysiological studies on *Micrasterias* I. Nuclear and cell division. *Phys. Plant.* **3** (1950), 1–16.
- [18] WURM, E.: Das Schwingrasenmoor des Seethalersees und seine Desmidiaceenflora. *Ber. Nat. Med. Ver. Salzburg* **6** (1982), 103–157.

Filmveröffentlichungen

- [19] KIERMAYER, O.: Differenzierung und Wachstum von *Micrasterias denticulata* (Conjugatae). Film C 924 des IWF, Göttingen 1966. Publikation von O. KIERMAYER, *Publ. Wiss. Film., Sekt. A Biol./Med.*, Bd. 1, H. 6 (1964–1966), 643–652.

- [20] MEINDL, U.: Störung der Cytomorphogenese von *Micrasterias denticulata* durch Hemmung der Proteinsynthese. Film D 1425 des IWF, Göttingen 1981. Publikation von U. MEINDL, Publ. Wiss. Film., Sect. Biol., Ser. 15, Nr. 2/D 1425 (1982), 8 S.
- [21] URL, W., und E. KUSEL-FETZMANN: Desmidiaceae-Fortbewegung durch Schleimausscheidung. Film E 1913 des IWF, Göttingen 1973. Publikation von W. URL und E. KUSEL-FETZMANN, Göttingen 1973, 9 S.

Abbildungsnachweis

Abb. 1–3: O. KIERMAYER und U. MEINDL.